

**ВПЛИВ СПЕРМІНУ ТА ПУТРЕСЦИНУ НА ЗВ'ЯЗУВАННЯ
ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦІЇ NF-караВ ЗІ СПЕЦИФІЧНИМИ
ПОСЛІДОВНОСТЯМИ ДНК***Н. О. АЛЕКСАНДРОВА¹, С. В. АВІЛОВ², С. П. ЗАЛІТОК¹*¹*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України;*²*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України;**e-mail: natikalex@hotmail.com*

С помощью метода флуоресцентного безызлучательного переноса энергии изучено влияние полиаминов (спермина и путресцина) на связывание субъединицы р50 ядерного фактора транскрипции NF-караВ со специфическими последовательностями ДНК в модельных экспериментах. Показано, что исследованные полиамины в концентрациях 1–500 мкМ способствуют образованию комплекса NF-караВ – ДНК. Полученные данные согласуются с результатами, полученными нами ранее методами компьютерного моделирования. Представленные в настоящей работе результаты позволяют предположить, что полиамины, избыточный синтез которых имеет место при опухолевом росте, могут принимать участие в регуляции транскрипции некоторых онкогенов фактором NF-караВ.

К л ю ч е в ы е с л о в а: фактор транскрипції NF-караВ, спермин, путресцин, флуоресцентний безызлучательний перенос енергії.

Поліаміни (ПА) – низькомолекулярні органічні ендogenous полікатиони – мають унікальне значення для регуляції численних біохімічних процесів, зокрема біосинтезу нуклеїнових кислот та білка, внаслідок чого вони відіграють важливу роль у процесах нормального та злоякісного росту. Відомо, що вміст ПА в ракових клітинах значно вищий, ніж у нормальних клітинах, але молекулярні механізми впливу ПА на трансформацію клітин та їхню проліферацію вивчено недостатньо [1,2].

Ймовірно ПА здатні регулювати транскрипцію генів через взаємодію з факторами транскрипції та специфічними до останніх послідовностями ДНК (NRE-послідовностями) [3,4].

Класичний ядерний фактор транскрипції NF-караВ – це гетеродимер, утворений субодиницями р50 і р65. Зв'язуванню субодиниці р50 зі специфічною послідовністю ДНК притаманна дуже висока афінність ($K_d = 10^{-12}$ М) [5]. NF-караВ відіграє важливу роль у різних сигнальних процесах. Активація NF-караВ обумовлена зовнішніми стимулами, такими як бактеріальні та вірусні продукти, різні цитокіни, форболові ефіри, оксидантний стрес, різні проапоптичні стимули. У відповідь на ці стимули інгібіторний білок фосфорилюється, NF-караВ транслокується в ядро та з'єднується зі специфічними послідовностями ДНК із загальною формулою GGGRNNYYCC (N – будь-який нуклеотид, R – пурин, Y – піримідин). Сайт зв'язування з NF-караВ ідентифікований як критич-

на регуляторна ділянка у великій кількості генів, у тому числі тих, що беруть участь у стимуляції клітинної проліферації та запобіганні апоптозу [6,7].

У попередніх дослідженнях за допомогою методів комп'ютерного моделювання ми теоретично обґрунтували можливість взаємодії ПА з фактором NF-караВ, виявили потенційний сайт зв'язування для ПА на поверхні білка р50 та показали, що за присутності поліамінів зростає спорідненість білка р50 до специфічної послідовності ДНК [8].

Флуоресцентні методи знаходять дедалі більш широке застосування для досліджень конформаційних змін біомакромолекул та специфічних взаємодій між ними [9,10]. Завдяки нечутливості до абсолютних концентрацій флуорофорів, геометрії зразка, інтенсивності випромінювання лампи, оптичної густини зразка та інших факторів, одним із найбільш перспективних методів флуоресцентної спектроскопії є такий, що заснований на використанні явища флуоресцентного безвипромінювального переносу енергії (FRET) [11,12].

Явище FRET – це перенос енергії збудженого стану від одного флуорофора (який називають донором) до іншого флуорофора (акцептора). Такий перенос є результатом диполь-дипольної взаємодії між цими флуорофорами, він відбувається без проміжного випромінювання та повторного поглинання фотона [13]. Ефективність переносу залежить від ступеня перекивання

спектра емісії донора та спектра поглинання акцептора, відносної орієнтації дипольних моментів переходів та відстані між донором та акцептором, що найбільш важливо для біологічних досліджень. Звичайно характеристична відстань між донором та акцептором, за якої ефективність безвипромінювального переносу енергії становить 50%, знаходиться в інтервалі від 2 до 5 нм, що відповідає порядку розміру багатьох глобулярних білків та товщині біологічних мембран [14]. З огляду на це, FRET широко застосовується для досліджень біологічних систем, будь-яких явищ, які впливають на відстань між донором і акцептором, відзначається на ефективності переносу енергії, що дозволяє кількісно охарактеризувати зазначені явища [15]. Середня відстань між молекулами, що дифундують у розведеному розчині, набагато більша, ніж відстань між компонентами специфічного комплексу; ефективність FRET обернено пропорційна шостому ступеню відстані між донором та акцептором. Якщо донор приєднаний до одного з партнерів специфічної взаємодії між біомолекулами (наприклад антитіла), а акцептор — до іншого (наприклад антигена), то в разі утворення комплексу ефективність FRET надзвичайно зростає, що дозволяє кількісно вивчати такі асоціації макромолекул [13]. Слід зазначити, що вивчення переносу енергії дає інформацію, яка принципово відрізняється від такої, яку можна одержати при вивченні інших флуоресцентних характеристик (гасіння, поляризації флуоресценції, реакцій у збудженому стані, тощо). Всі ці характеристики залежать від взаємодії флуорофора з тими молекулами, які його безпосередньо оточують, у той саме час як явище FRET майже “нечутливе” до властивостей молекул, що знаходяться між донором та акцептором або навколо них. Ефективність FRET залежить переважно від відстані між донором та акцептором [14]. Зважаючи на це, однозначна інтерпретація даних FRET є набагато простішою, ніж інтерпретація змін інших параметрів флуоресценції.

Матеріали і методи

Реактиви і матеріали. Використано тетрагідрохлорид сперміну та дигідрохлорид путресцину фірми «Sigma» (США) та рекомбінантний білок р50 (одна з субодиниць фактора транскрипції NF-каппаВ) фірми «Promega Co.» (США). Чистоту білка р50 перевірено за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію.

Штучно синтезовані дволанцюгові олігонуклеотиди NRE (послідовність одного із ланцюгів: 5'-ACGGCAGGGGATTCCCTCT-3') з молеку-

лою флуоресцентного зонда Texas Red, ковалентно приєднаною до 3'-кінця одного з ланцюгів (одержано в Інституті молекулярної біології Російської академії наук, Москва). Чистоту одержаних препаратів підтверджено за допомогою високоефективної рідинної хроматографії.

Мічення білка р50 флуоресцентним зондом. Для приєднання зонда родамін В до аміногруп білка р50 використовували реакціоздатне похідне такого зонда — родамін В ізотіоціанат (RBITC, «Sigma», США). До 25 мкл розчину р50 (9 нМ в 0,1 М натрійгідрокарбонатному буфері, рН 9,0) додавали 2 мкл розчину RBITC (0,2 мг/мл у ДМФ). Реакційну суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 120 хв у темряві за постійного перемішування. Надалі для видалення надлишку RBITC та заміни буфера реакційну суміш наносили на 0,9×10 см колонку, заповненою Sephadex G-25 Superfine («Amersham Biosciences», Швеція). Елюцію проводили буфером Дігнама (20 мМ HEPES; 0,1 М KCl; 0,2 мМ EDTA; 0,5 мМ фенілметилсульфонілфторид; 0,5 мМ дитіотреїтол), який зазвичай використовують при вивченні взаємодії ДНК-білок [16]. Фракції, що містили мічений білок (ідентифіковані за флуоресцентними спектрами), використовували в наступних дослідах.

Дослідження зв'язування р50 з NRE за допомогою методу FRET. При вивченні зв'язування р50 з NRE за допомогою методу FRET як донор використовували родамін В, ковалентно приєднаний до р50, як акцептор — барвник Texas Red, ковалентно приєднаний до 3'-кінця одного з ланцюгів 19-мера NRE. Досліди проводили при 25 °С у буфері Дігнама, концентрація мічених NRE становила 9–36 нМ, р50 — 9 нМ.

Для дослідження використовували спектрофлуориметр із ксеноновою лампою, обладнаний термостатованим кюветним відділенням. Для спостереження явища FRET флуоресценцію збуджували при 530 нм (максимум поглинання RB). Ефективність FRET визначали за співвідношенням інтегральної інтенсивності піків емісії TR (615 нм) та RB (575 нм), які було визначено після розкладання спектрів на компоненти за допомогою програми “Siano”. Ширина щілини монохроматора збудження — 10 нм, монохроматора емісії — 5 нм.

До розчину кон'югату р50-RB додавали кон'югат NRE-TR. Спектри флуоресценції записували після 15 хв інкубації. Надалі в кювету послідовно додавали аліквоти маточних розчинів поліамінів у буфері Дігнама (для різних кінцевих концентрацій використовували маточні розчини з концентрацією 60 або 600 мкМ). Після додавання кожної аліквоти поліамінів зразок

інкубували протягом 15 хв при кімнатній температурі. Дослідження також було проведено при іншій послідовності додавання компонентів: спочатку змішували та інкубували 30 хв розчини ПА та NRE-TR, а потім додавали розчин p50.

Для врахування гасіння флуоресценції TR, спричиненого поліамінами, величини інтегральної інтенсивності піка емісії TR множили на відповідні коефіцієнти, одержані в контрольних дослідах для кожної концентрації поліамінів. Було використано відоме співвідношення $F_0/F \sim [Q]$, де F_0 та F – інтенсивність флуоресценції за відсутності та за присутності речовини-“гасника” відповідно; $[Q]$ – молярна концентрація речовини-“гасника” [13,14].

Розкладання флуоресцентних спектрів на компоненти. Оскільки смуги емісії RB та TR частково перекриваються, то для коректного аналізу відносних змін інтенсивності цих смуг було необхідно виконати розкладання сумарних флуоресцентних спектрів на компоненти (в англійській літературі цю процедуру називають «deconvolution» [17]). Розкладання спектрів на компоненти проводили за допомогою спеціалізованої програми “Siano”, яка заснована на ітераційному нелінійному методі найменших квадратів на базі алгоритму Флетчера-Пауелла [17]. Форму окремих піків апроксимували за нормальною логарифмічною функцією [18], що враховує асиметрію спектральних смуг. Зазначена функція оперує чотирма параметрами: максимальна амплітуда, положення максимуму, положення напівмаксимальних амплітуд для короткохвильової та довгохвильової частин смуги.

Результати та обговорення

При вивченні зв’язування p50 з NRE за допомогою методу FRET визначено, що спектр емісії RB досить значно перекривається спектром збудження TR (рис. 1). Отже, пара флуорофорів є придатною для дослідів із використанням явища FRET.

Спочатку було підібрано таке співвідношення концентрацій NRE-TR і p50-RB, яке забезпечує найбільш вірогідне спостереження явища FRET (рис. 2), як це звичайно прийнято для проведення досліджень цим методом [11].

Для подальших досліджень нами було використано співвідношення концентрацій $[p50-RB]/[NRE-TR]$, яке дорівнює 1/4.

У попередніх дослідах визначено, що путресцин (діамін) та спермін (тетраамін) спричинюють значне гасіння флуоресценції TR, що погоджується з даними літератури щодо здатності амінів утворювати комплекси з багатьма збудженими флуорофорами, таким чином спричинюючи безвипромінювальний перехід збудженого стану в основний (тобто гасіння) [14]. З огляду на це, для врахування ефекту гасіння було вивчено залежність інтенсивності флуоресценції NRE-TR від концентрації сперміну та путресцину (рис. 3, A і B відповідно). Було одержано коефіцієнти зменшення інтенсивності флуоресценції TR для ряду концентрацій ПА, які використовували в дослідах, їхнього впливу на зв’язування NRE – p50. У наступних розрахунках співвідношення інтенсивності флуоресценції TR та RB, значення інтенсивності флуоресценції TR, що одержували

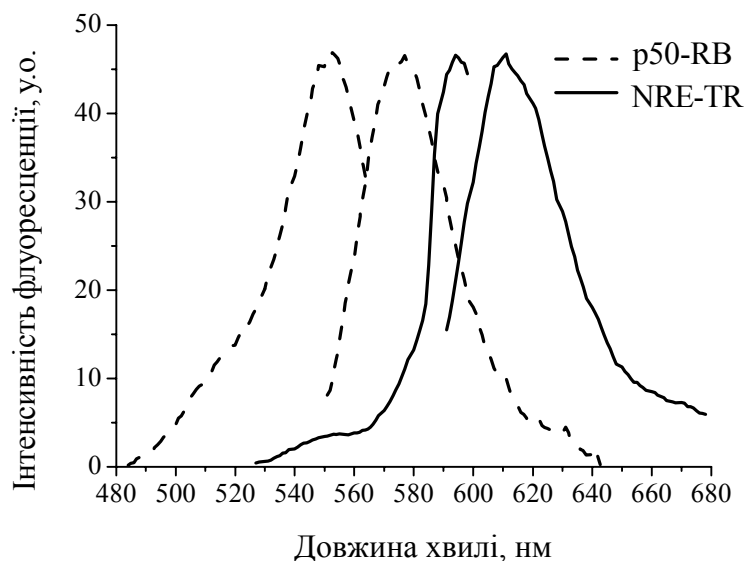


Рис. 1. Нормовані спектри збудження та емісії кон'югатів p50-RB та NRE-TR. Збудження флуоресценції p50-RB при 530 нм, збудження флуоресценції NRE-TR при 575 нм (спектри збудження одержано при довжині хвилі емісії для p50-RB – 575 нм, для NRE-TR – 615 нм).

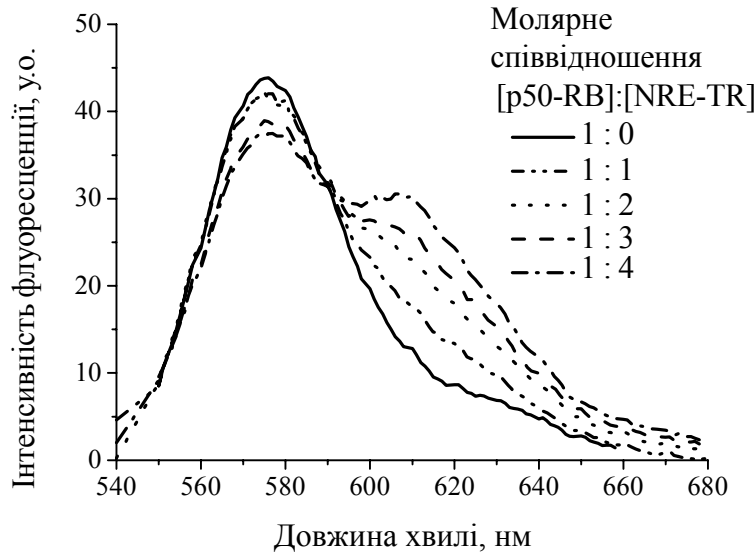


Рис. 2. Оптимізація умов спостереження FRET: спектри флуоресценції суміші кон'югатів NRE-TR і p50-RB при збудженні за 530 нм.

після розділення спектрів (приклад розділення представлено на рис. 4), помножили на відповідний коефіцієнт, визначений для даної концентрації відповідного поліаміна.

Було виявлено, що ефективність переносу енергії з RB на TR зростає зі збільшенням концентрації сперміну в інтервалі від 1 до 150 мкМ і при подальшому підвищенні концентрації сперміну до 500 мкМ виходить на плато (рис. 5).

У випадку преінкубації сперміну (150 мкМ) з NRE перед додаванням p50 позитивний ефект сперміну на утворення комплексу NRE – p50 дещо, хоча і незначно, більш виражений, ніж за

додавання сперміну в тій самій концентрації до суміші NRE + p50 (рис. 6).

Путресцин в інтервалі концентрацій до 150 мкМ, як і спермін, також спричинює збільшення ефективності переносу енергії. Таким чином і спермін, і путресцин сприяють зв'язуванню NRE з p50. Використання більших концентрацій путресцину не спричинює подальшого зростання зв'язування NRE – p50 (рис. 5).

Одержані результати узгоджуються з даними про те, що поліаміни сприяють утворенню комплексу NF-карраВ – ДНК, які ми одержали методами комп'ютерного моделювання [8].

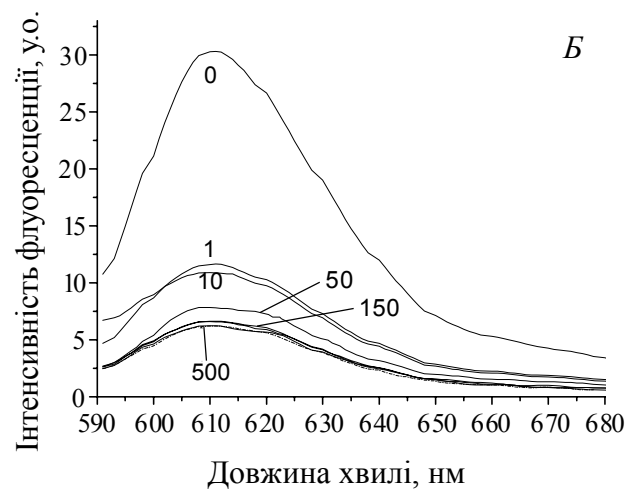
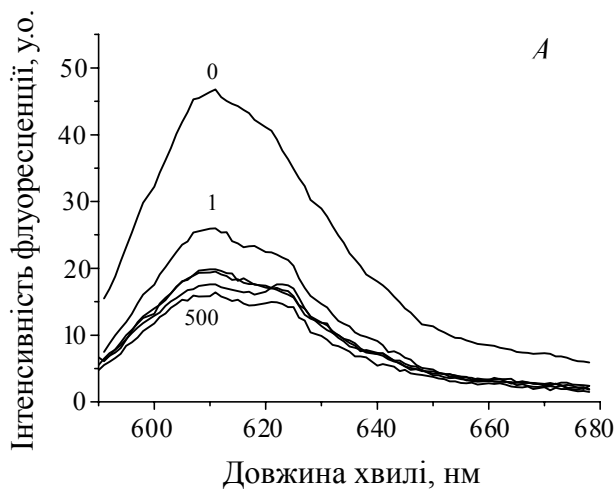


Рис. 3. Гасіння флуоресценції NRE-TR за присутності різних концентрацій поліамінів (А – спермін, В – путресцин). Концентрації поліамінів (мкМ) позначено на графіках; кожний представлений спектр є результатом усереднення 3 вихідних спектрів.

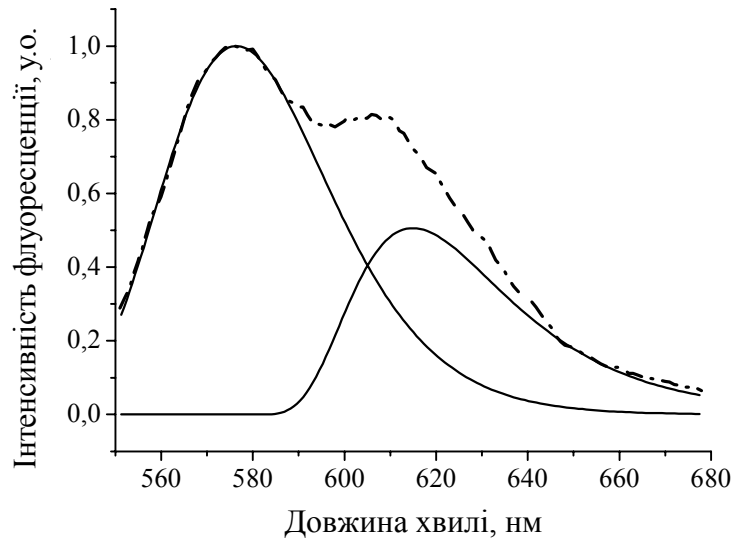


Рис. 4. Приклад розкладу на компоненти спектру флуоресценції суміші кон'югатів p50-RB та NRE-TR (збудження при 530 нм): — . — вихідний сумарний спектр флуоресценції; ——— компоненти, що відповідають флуоресценції p50-RB та NRE-TR.

N. Shah та співавт. [3] вивчали вплив поліамінів на зв'язування фактора транскрипції NF-карраВ з ДНК методом аналізу змін електрофоретичної рухомості (Electrophoretic Mobility Shift Assay). Вони показали, що оброблення сперміном екстракту клітин (наприклад клітинної лінії MCF7), що містив NF-карраВ, з подальшим додаванням специфічних послідовностей ДНК призводить до концентраційнозалежного збільшення зв'язування NF-карраВ з ДНК. Так, за додавання сперміну в концентрації 0,5 мМ до екстракту клітин MCF7 спостерігалось 2,5-разове

збільшення зв'язування ДНК – NF-карраВ порівняно зі зв'язуванням за відсутності поліамінів. У разі преінкубації 0,5 мМ сперміну з ДНК зв'язування NF-карраВ – ДНК зростає в 5 разів. Отже, наші результати якісно погоджуються з результатами, одержаними у роботі [3].

Одержані результати дають підставу зробити припущення, що поліаміни, збільшення синтезу яких спостерігається за злякисного росту, можуть бути задіяні в регуляції транскрипції деяких онкогенів фактором NF-карраВ.

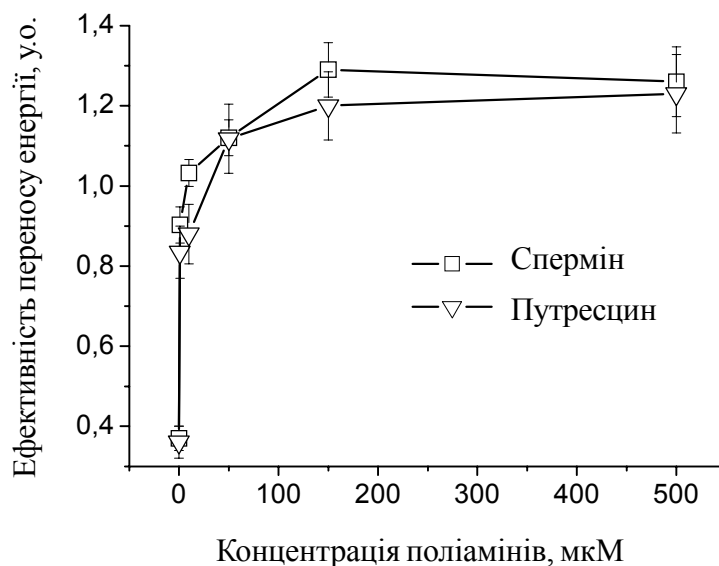


Рис. 5. Вплив поліамінів на ефективність безвипромінювального переносу енергії між p50-RB та NRE-TR. Ефект гасіння флуоресценції TR поліамінами враховано (для сперміну n = 4, для путресцину n = 3).

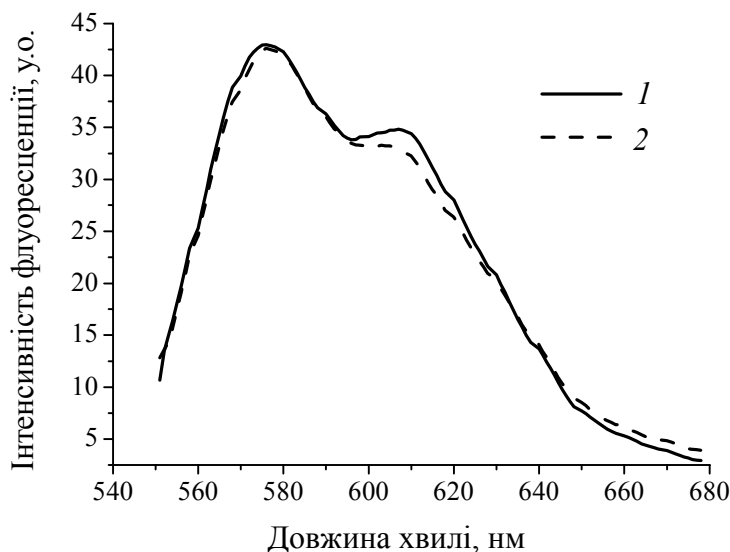


Рис. 6. Залежність ефективності безвипромінювального переносу енергії між p50-RB та NRE-TR від послідовності додавання компонентів реакційної суміші: 1 – преінкубація NRE зі сперміном, потім додавання p50; 2 – преінкубація p50 з NRE, потім додавання сперміну (концентрація сперміну 150 мкМ, довжина хвилі збудження 530 нм). Кожний представлений спектр є результатом усереднення 3-х вихідних спектрів.

Роботу виконано за підтримки гранта № UB1-2446-KV-02 Civilian Research and Development Foundation (CRDF).

EFFECTS OF SPERMINE AND PUTRESCINE ON THE BINDING OF THE TRANSCRIPTION FACTOR NF- κ B TO SPECIFIC DNA SEQUENCES

N. O. Aleksandrova¹, S. V. Avilov², S. P. Zaletok¹

¹Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: natikalex@hotmail.com

S u m m a r y

Using fluorescence resonance energy transfer technique, effects of polyamines (spermine and putrescine) on the binding of p50 subunit of the nuclear transcription factor NF- κ B to specific DNA sequences were studied in model experiments. It is demonstrated that polyamines in the concentration range from 1 to 500 μ M facilitate the binding of NF- κ B to specific DNA sequences. The data currently obtained agree with our previous predictions made by the computer modelling techniques. Our results presented in this work allow us to suggest that

polyamines (excessive synthesis of which proceeds in tumor growth) may participate in the regulation of transcription of several oncogenes by the factor NF- κ B.

К е у w o r d s: transcriptional factor NF- κ B, spermine, putrescine, fluorescent resonance energy transfer.

1. Бердинских Н. К, Залеток С. П. Полиамины и опухолевый рост. К.: Наук. думка. 1987. 136 с.
2. Cohen S. S. Guide of the polyamines. New York: Oxford University Press. 1998. 240 p.
3. Shah N., Thomas T., Shirahata A. et al. // Biochemistry. 1999. **38**. P. 14763–14774.
4. Shah N., Thomas T., Lewis J. et al. // Oncogene. 2001. **20**. P. 1715–1729.
5. Kuriyan J., Thanos D. // Structure. 1995. **3**. P. 135–141.
6. Sovak M. A., Bellas R. E., Kim D. W. et al. // J. Clin. Invest. 1997. **100**. P. 2952–2960.
7. Karin M., Cao Y., Greten R., Li Z.-W. // Nature reviews. 2002. **2**. P. 301–310.
8. Залеток С. П., Яковенко О. Я., Александрова Н. О. та ін. // Укр. біохім. журн. 2002. **74**. С. 133–138.
9. Эфтинк М. Р. // Биохимия. 1998. **63**, вып. 3. С. 327–337.
10. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука. 1980. 320 с.

11. Oswald B., Lehmann F., Simon L. et al. // *Anal. Biochem.* 2000. **280**. P. 272–277.
12. Wu P., Brand L. // *Ibid.* 1994. **218**. P. 1–13.
13. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков. К.: Наук. думка. 1988. 280 с.
14. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир. 1986. 496 с.
15. Szollosi J., Damjanovich S., Matyus L. // *Cytometry.* 1998. **34**. P. 159–179.
16. Dignam J., Lebovitz R., Roeder R. // *Nucleic Acid Res.* 1983. **11**. P. 1475–1489.
17. Doroshenko A. O., Sychevskaya L. B., Grygorovich A. V., Pivovarenko V. G. // *J. Fluorescence.* 2002. **12**. P. 455–464.
18. Siano D. B., Metzler D. E. // *J. Chem. Phys.* 1969. **51**. P. 1856–1861.

Отримано 09.08.2004